

# Verfahren und Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen Verfahren und Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen

**Patent number:** DE10104008  
**Publication date:** 2002-08-01  
**Inventor:** BADER AUGUSTINUS [DE]  
**Applicant:** BIONETHOS HOLDING [DE]  
**Classification:**  
- **International:** C12M3/00; C12M1/04  
- **European:** A61F2/30C; A61L27/38; C12M3/00  
**Application number:** DE20011004008 20010131  
**Priority number(s):** DE20011004008 20010131

Abstract not available for DE10104008

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

19 BUNDESREPUB  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschr  
10 DE 101 04 008 A 1

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 12 M 3/00  
C 12 M 1/04

21 Aktenzeichen: 101 04 008.3  
22 Anmeldetag: 31. 1. 2001  
43 Offenlegungstag: 1. 8. 2002

DE 101 04 008 A 1

71 Anmelder:  
Bionethos Holding, 31275 Lehrte, DE  
74 Vertreter:  
Lorenz und Kollegen, 89522 Heidenheim

72 Erfinder:  
Bader, Augustinus, Dr.med., 31275 Lehrte, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren und Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen

57 Bei einem Verfahren zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen auf einer modellierbaren Trägerstruktur werden die Zellen zur Bildung einer Zellschicht in einen Zellkulturraum zwischen der Trägerstruktur oder einer auf der Trägerstruktur aufgetragenen Folie und einer zweiten Folie, insbesondere einer mikroporösen Folie, eingebracht. Sauerstoff und/oder Nährmedium werden in den Zellkulturraum eingeleitet. Der Zellkulturraum wird durch eine Gasmedium wechselnde Druckbelastung ausgesetzt.

DE 101 04 008 A 1

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen nach der im Oberbegriff von Anspruch 1 näher definierten Art. Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen.

[0002] In der älteren Anmeldung des Erfinders DE 199 35 643.2 ist ein Verfahren und eine Vorrichtung der eingangs genannten Art beschrieben.

[0003] Es hat sich nun herausgestellt, daß die Bildung einer Zellschicht und das Zellwachstum deutlich verbessert wird, wenn man die Zellen einer Druckbelastung aussetzt. Hierzu ist es aus der Praxis bereits bekannt, einen Zellkulturraum durch mechanische Einrichtungen, wie z. B. einen Stempel, z. B. wie in der US 6,060,306, zu belasten. Neben dem hierfür erforderlichen konstruktiven Aufwand entspricht eine derartige Belastung aufgrund der dadurch erzielten Heterogenitäten nicht in-vivo-Verhältnissen. In der US 5,928,945 wird hauptsächlich über Scherstress mittels Kulturmedium eine mechanische Belastung von z. B. Knorpelzellen versucht. Dies ist jedoch unphysiologisch, da z. B. in Gelenkbereichen keine derartigen Perfusionen auftreten. Zusätzlich ist der Sauerstoffgehalt aufgrund der limitierten Transportkapazität für Sauerstoff nicht bei allen Gewebearten in physiologische Bereiche einstellbar (McLimans et al. 1968).

[0004] In der US 6,060,306 ist auch ein Apparat beschrieben, in dem ein Knorpelkonstrukt innerhalb einer Kultivierungskammer durch Bewegungen der Außenwände wie in einem Blasebalg bewegt wird. Diese Bewegungsprozesse haben den Nachteil, daß die Bewegungsmuster einen hohen mechanischen Belastung der Membranstrukturen bedingen, insbesondere dann, wenn diese aus Permeabilitätszwängen für Sauerstoff besonders dünn sind, d. h. eine Dicke im Mikrometerbereich haben. Dies führt dazu, daß die Membrane nach wenigen Tagen reißen und die Produkte unsteril werden und dadurch für Implantationen nicht mehr geeignet sind. Weiterhin können die Membrane aufgrund der Bewegungsmuster, die ständig konvex-konkave Verformungen hervorrufen, auch nur entsprechend punktuell Druckverformungen erzeugen. Dadurch kommt es zu Oszillationen im Kulturmediumbereich und Druck-Heterogenitäten in den biologischen Geweben im Bioreaktor.

[0005] Der vorliegenden Aufgabe liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen zu schaffen, wobei soweit wie möglich in-vivo-Verhältnisse simuliert werden können.

[0006] Insbesondere sollen in dem bioartificialen Gewebe innerhalb des Bioaktors in allen Bereichen vollständig homogene Druckverhältnisse erzeugt werden können, ohne jegliche konvex-konkave Membranverformungen der Außenwände des Systems. Wenn diese Membrane zusätzlich Oxygenationsaufgaben übernehmen sollen, um unerwünschte Heterogenitäten der Transportdistanzen für die O<sub>2</sub> Diffusion und damit Mangelzustände zu vermeiden, so müssen sich diese in einer stabilen und möglichst kurzen Distanz zu den biologischen Konstrukten befinden, und idealerweise diesen immer direkt anliegen, d. h. sie müssen allen Bewegungen des biologischen Konstrukts in identischer Weise folgen, statt dies blasebalgartig zu induzieren.

[0007] Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch das im kennzeichnenden Teil von Anspruch 1 genannte Merkmal gelöst.

[0008] Eine Vorrichtung zur Lösung der gestellten Aufgabe ist aus Anspruch 3 ersichtlich.

[0009] Durch ein Gasmedium bzw. durch die Bildung eines Gasraumes lassen sich in-vivo-Verhältnisse sehr gut si-

mulieren. So ist es z. B. möglich, die Zellschicht in dem Zellkulturraum sehr gezielt wechselnden und homogenen Druckbelastungen auszusetzen, welche beliebig häufig und beliebig schnell ohne großen Aufwand sehr gezielt gesteuert werden können. Sobald es über die externe Gasphase zu einer Druckeinwirkung auf die äußere Folienschicht kommt, legt sich diese vollständig um das Implantat an. Dadurch können auch sehr komplexe 3-D Strukturen vollständig ummantelt werden. Die Diffusionswege für O<sub>2</sub> werden dadurch gleichzeitig auf fast 0 reduziert. Bei 3-D Strukturen können die Folien/Membranschichten idealerweise schon dem Implantat entsprechende Formen besitzen, so daß im Druckbelastungsfall eine einfache Anmodellierung möglich ist.

[0010] Die Bildung eines Gasraumes kann auf verschiedene Weise erfolgen. Hierzu kann z. B. ein druckfestes Gehäuse vorgesehen sein, das in vorteilhafter Weise gleichzeitig als Bioreaktor ausgebildet ist. In einem derartigen Bioreaktor kann dann die Zellschicht in dem Zellkulturraum als selbständige Einheit behandelt werden. Hierzu kann die Einheit aus der mikroporösen Folie, dem Zellkulturraum und einer Schutzfolie gebildet sein, die auch die Trägerstruktur umgibt. In diesem Falle läßt sich dann die Einheit bei Bedarf aus dem Bioreaktor entnehmen – gegebenenfalls nach Entfernung von Anschlüssen für Sauerstoff und/oder Nährmedium – und z. B. einfrieren oder als Implantat transportieren.

[0011] Vorteilhafte Weiterbildungen und Ausgestaltungen ergeben sich aus den nachfolgend anhand der Zeichnung prinzipiell beschriebenen Ausführungsbeispielen.

[0012] Es zeigt:

[0013] Fig. 1 eine Prinzipdarstellung einer ersten Ausführungsform mit Gelenk-Knorpeln, die auf einer Trägerstrukturschicht, welches ein Kniegelenk darstellen soll, gezüchtet werden; und

[0014] Fig. 2 eine Prinzipdarstellung einer Vorrichtung, ähnlich der nach Fig. 1, mit einer Gegenstruktur.

[0015] Nachfolgend wird die Erfindung anhand einer Vorrichtung zur Bildung von hyalinen Knorpeln als zu züchtenden Zellen für eine Kniegelenk beschrieben. Selbstverständlich ist diese Anwendungsart nur beispielsweise zu sehen. Im Rahmen der Erfindung sind noch zahlreiche andere Anwendungsfälle möglich.

[0016] Auf eine aus Trikalziumphosphat gebildete Trägerstruktur 1 werden Knorpelzellen als Zellen 2 zur Bildung einer Zellschicht aufgelegt. Wie ersichtlich, entspricht die Trägerstruktur 1 in ihrer Form einem Kniegelenk. Über die Zellen 2 wird eine mikroporöse Folie 3 gelegt, welche genügend elastisch sein muß, um das Zellwachstum nicht zu behindern. Als Material hierfür ist z. B. PTFE möglich. Die mikroporöse Folie 3 muß entweder die Trägerstruktur 1 dicht abschließen oder diese komplett umschließen. Bei der dargestellten Ausführungsform liegt sie seitlich an der Trägerstruktur 1 dicht an, während die Trägerstruktur 1 auf einer Platte 4 ruht. Die mikroporöse Folie 3 ist mit einem Zulaufanschluß 5 und einem Rücklaufanschluß 6 versehen, über die Nährmedium im Durchlaufverfahren einbringbar ist. Gleichzeitig kann hier auch Sauerstoff zugeführt werden, sofern Sauerstoff nicht aus der Umgebung der mikroporösen Folie 3 durch die Folie selbst eingebracht wird.

[0017] Wie ersichtlich, bildet die mikroporöse Folie 3 zusammen mit der Trägerstruktur 1 auf diese Weise einen Zellkulturraum 7 für die darin angeordneten Zellen 2.

[0018] Die mikroporöse Folie 3 und die Trägerstruktur 1 bilden – gegebenenfalls zusammen mit der Platte 4 – eine Einheit, welche in ein druckdichtes Gehäuse 8 eingesetzt ist. Das druckdichte Gehäuse 8 bildet einen Bioreaktor. In das druckdichte Gehäuse 8 wird über einen Druckanschluß 9 eine Verbindung mit einem Druckmedium 10 geschaffen. In

dem druckdichten Gehäuse 8 wird auf diese Weise ein Gasraum 11 geschaffen, der durch das Druckmedium 10 in gewünschter Weise unter wechselnde Druckbelastungen gesetzt wird. Diese wechselnden Druckbelastungen wirken sich über die mikroporöse Folie 3 auf die sich in dem Zellkulturraum 7 befindenden Zellen aus. Die mikroporöse Folie kann auch entfallen, so daß die Zellen direkt von der Schutzfolie ummodelliert werden. Wenn für eine separate Sauerstoff- oder Luftzufuhr für die Zellen 2 gesorgt wird, kann als Gasmedium auch jedes andere Gas verwendet werden.

[0019] Im Bedarfsfalle kann die aus der mikroporösen Folie 3 und der Trägerstruktur 1 gebildete Einheit auch noch von einer weiteren Schutzfolie 12 umgeben sein (siehe gestrichelte Darstellung). Die Schutzfolie 12 dient für einen Transport der Einheit aus dem Bioreaktor 8 und schließt die Einheit damit steril ab. Als Schutzfolie 12 lassen sich verschiedene Folien verwenden. Dadurch, daß in dem Inneren des Gehäuses 8 ein Gasraum 11 gebildet wird, sollte die Schutzfolie 12 entsprechend modellierbar und gaspermeabel sein. Der Gasraum 11 kann dabei sowohl innerhalb der Schutzfolie 12 als auch außerhalb davon gebildet werden. Im letzten Falle ist deshalb in der Schutzfolie 12 ein Anschluß für eine Verbindung mit der Druckquelle 10 vorzusehen.

[0020] Anstelle von Trikalziumphosphat für die Trägerstruktur 1 können im Knochenersatzbereich auch Kollagene verwendet werden, wobei z. B. auch ein Meniskus gezüchtet werden kann. Ebenso sind Bindegewebestrukturen, Polymere, wie Polylaktide oder andere chemische Strukturen, verwendbar.

[0021] Wesentlich ist, daß man Formen modellieren kann, die einem gewünschten Implantat entsprechen. Auf diese Weise kann man z. B. bei einem Defekt ein Implantat einer bestimmten Größe herausuchen, wozu z. B. über computer-tomographische Bilder eine entsprechende Analyse durchgeführt und dann in dem Bioreaktor 8 oder gegebenenfalls vorher entsprechend eine gewünschte Trägerstruktur 1 geformt wird, auf der dann die dazugehörigen Zellen gezüchtet werden.

[0022] Zusätzlich lassen sich im Bioreaktor 8 auch elektrische Anschlüsse vorsehen, durch die man über entsprechende Verbindungsleitungen (nicht dargestellt) elektrische Impulse den Zellen 2 auflegen kann, womit noch bessere in-vivo-Simulationen erzielt werden können.

[0023] Die in der Fig. 2 dargestellte Ausführungsform entspricht im wesentlichen der in der Fig. 1 besprochenen Form, weshalb für die gleichen Teile auch die gleichen Bezugszeichen beibehalten worden sind.

[0024] Unterschiedlich ist lediglich, daß über der mikroporösen Folie 3 noch eine Meniskusstruktur 13 aufgebracht worden ist, über der wiederum eine Trägerstruktur 14 liegt. Auf diese Weise werden noch bessere in-vivo-Verhältnisse simuliert. Zur Bildung einer transportablen Einheit kann das ganze dann ebenfalls von einer Schutzfolie 12 umgeben sein, durch welche Anschlüsse 5 und 6 zur Zu- und Abfuhr von Nährmedium und/oder Sauerstoff geführt sind. Der Gasraum 11 kann wiederum außerhalb der Schutzfolie 12 oder auch innerhalb über einen entsprechenden Druckanschluß gebildet werden.

[0025] Wie erwähnt, werden die Zellen zur Bildung einer Zellschicht in einem Zellkulturraum 7 zwischen zwei Folien oder zwischen einer Folie und der modellierbaren Trägerstruktur 14 eingebracht. Ebenso kann die Trägerstruktur bilateral wie in einer Form mit zwei oder mehr Hälften angebracht sein. Die Form kann auch während dem Besiedlungsprozess ummodelliert, d. h. unter Annahme einer neuen Form angepasst werden.

[0026] Wesentlich ist, daß diese in sich mit Zellen/Matrix befüllbare Struktur in eine Kammer eingebracht werden kann, die mittels einer Gas- oder Flüssigkeitsphase einer Druckbelastung, die auch zyklischer Natur sein kann, ausgesetzt werden kann. Anstelle eines Gasmediums kann selbstverständlich auch ein flüssiges Medium verwendet werden.

[0027] Die Form der Folien ist reversiblen Druckbelastungsprozessen vollständig anpassungsfähig, da sie weitestgehend nicht einer eigenen Vorspannung unterliegt. Das heißt, wesentlich ist nicht die Elastizität der Folien, sondern das positionskonforme Anliegen dieser Folien, welches durch eine sehr hohe Compliance oder Dehnbarkeit ermöglicht wird. Die Folien können somit anmodelliert werden bzw. werden durch Druckaufwendung maximal und homogen anmodelliert. Die Folien können auch profilierend verformt werden. Auch Innenprofilierungen für den Zellkulturraum 7 sind möglich.

[0028] Diese Außenfolie 12 kann auf dem zu besiedelnden Trägersubstrat 1 somit bereits initial, d. h. vor Beginn des Druckbelastungsprozesses, möglichst vollständig aufliegen, und kann damit die ansonsten durch eine reversible Druckbelastung ursächlich bedingten Verschleißerscheinungen verhindern und direkt auch profilgebend wirken. Diese Profilgebung kann auch noch dadurch unterstützt werden, indem der von außen applizierte Druck über ein Druckprofil formend wirkt.

[0029] In den Behandlungsraum wird das zu besiedelnde Trägersubstrat 1, z. B. in einer in vivoartigen Form im Sinne eines Profils, Struktur auch als Hohlkörper (shell) eingebracht. Diese Strukturen können dann innerhalb und/oder außerhalb als auch transmural mit Substraten und Zellen besiedelt werden. Sie können auch mit Kulturmedium und Sauerstoff durchströmt werden.

[0030] Von Vorteil ist auch die Flexibilität der Vorrichtung und des Verfahrens, da die inneren Bioreaktorenbauteile entnehmbar sind und dadurch für Transport- und Kryoprozesse zugänglich sind.

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung Verfahren zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen auf einer modellierbaren Trägerstruktur, wobei die Zellen zur Bildung einer Zellschicht in einen Zellkulturraum zwischen der Trägerstruktur oder einer auf die Trägerstruktur aufgetragenen Folie und einer zweiten Folie, insbesondere einer mikroporösen Folie eingebracht werden, wobei Sauerstoff und/oder Nährmedium in den Zellkulturraum eingeleitet wird, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellkulturraum (7) durch ein Gasmedium wechselnden Druckbelastungen ausgesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß um den Zellkulturraum (7) und wenigstens teilweise um die Trägerstruktur (1) eine Schutzfolie (12) gelegt wird, wobei als Trägerstruktur (1) eine Form und Zusammensetzung verwendet wird, die einer in-vivo-Struktur weitgehend nachgebildet oder nachbildbar ist, und daß die beiden Folien (3, 12) mit der Trägerstruktur (1) als selbständige Einheit in einen Bioreaktor eingebracht werden.
3. Vorrichtung zum Züchten und/oder Behandeln von Zellen auf einer Trägerstruktur, wobei die Zellen zur Bildung einer Zellschicht in einen Zellkulturraum zwischen der Trägerstruktur oder eines auf die Trägerstruktur aufgetragenen Folie und/oder einer mikroporösen Folie eingebracht sind, wobei Sauerstoff und/oder Nährmedium in den Zellkulturraum einleitbar ist, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellkulturraum (7) in

einem Gasraum (11) angeordnet ist, der mit wenigstens einem Druckanschluß zur Verbindung mit einer Druckquelle (10) versehen ist oder der durch eine Druckquelle (10) unter wechselnden Druck setzbar ist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Gasraum (11) durch ein den Zellkulturräum (7) und die Trägerstruktur (1) umgebendes druckdichtes Gehäuse (8) gebildet ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das druckdichte Gehäuse (8) einen Bioreaktor bildet, in welchem der Zellkulturräum (7) vorzugsweise zwischen der mikroporösen Folie (3) und einer Schutzfolie (12), die auf und um die Trägerstruktur (1) gelegt ist, gebildet ist, wobei die beiden Folien (3, 12) und die Trägerstruktur (1) als selbständige Einheit in dem Bioreaktor angeordnet sind.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur (1) in Form und Zusammensetzung wenigstens weitgehend einer in-vivo-Struktur nachgebildet ist oder modellierbar ist.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur (1) aus Kalziummaterial, insbesondere Kalziumphosphat, gebildet ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur (1) aus Kollagen/extrazellulärer Matrix gebildet ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerstruktur (1) aus einem biodegradablen Polymer, wie z. B. Polylaktid, gebildet ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß über der mikroporösen Folie (3) oder der Trägerstruktur bzw. der ersten Außenfolie eine zweite Struktur (14) angeordnet ist, die in Form und gegebenenfalls in ihrer Zusammensetzung einer in-vivo-Gegenstruktur zu der Trägerstruktur (1) nachgebildet ist.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -

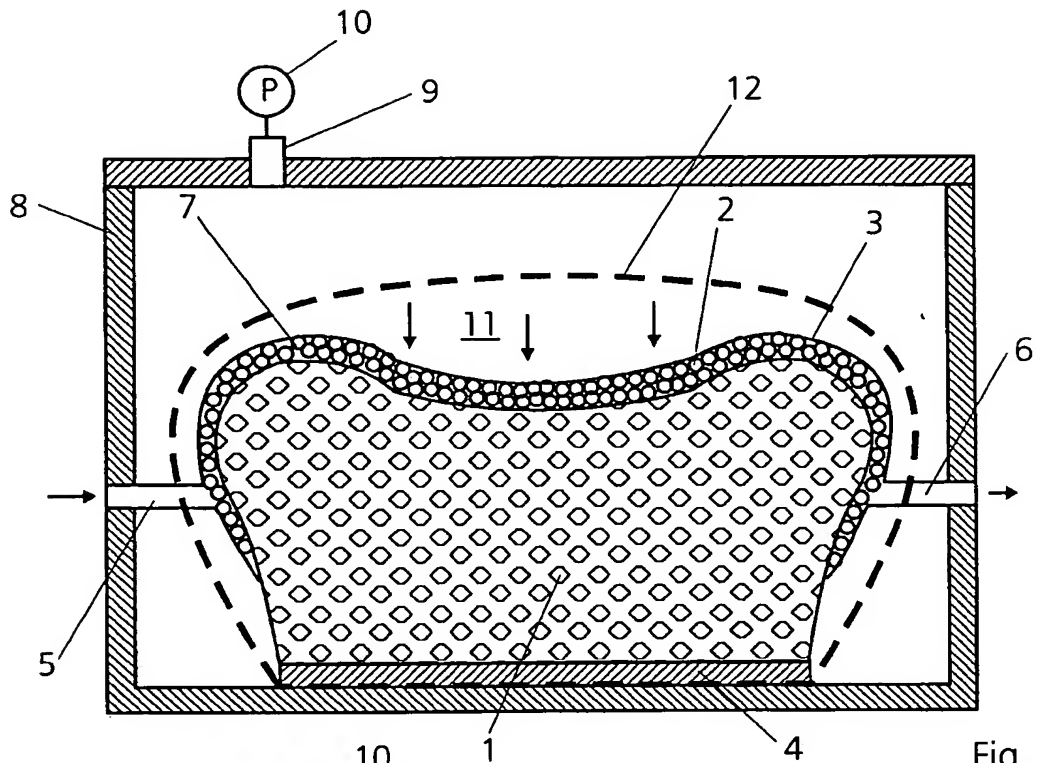


Fig. 1

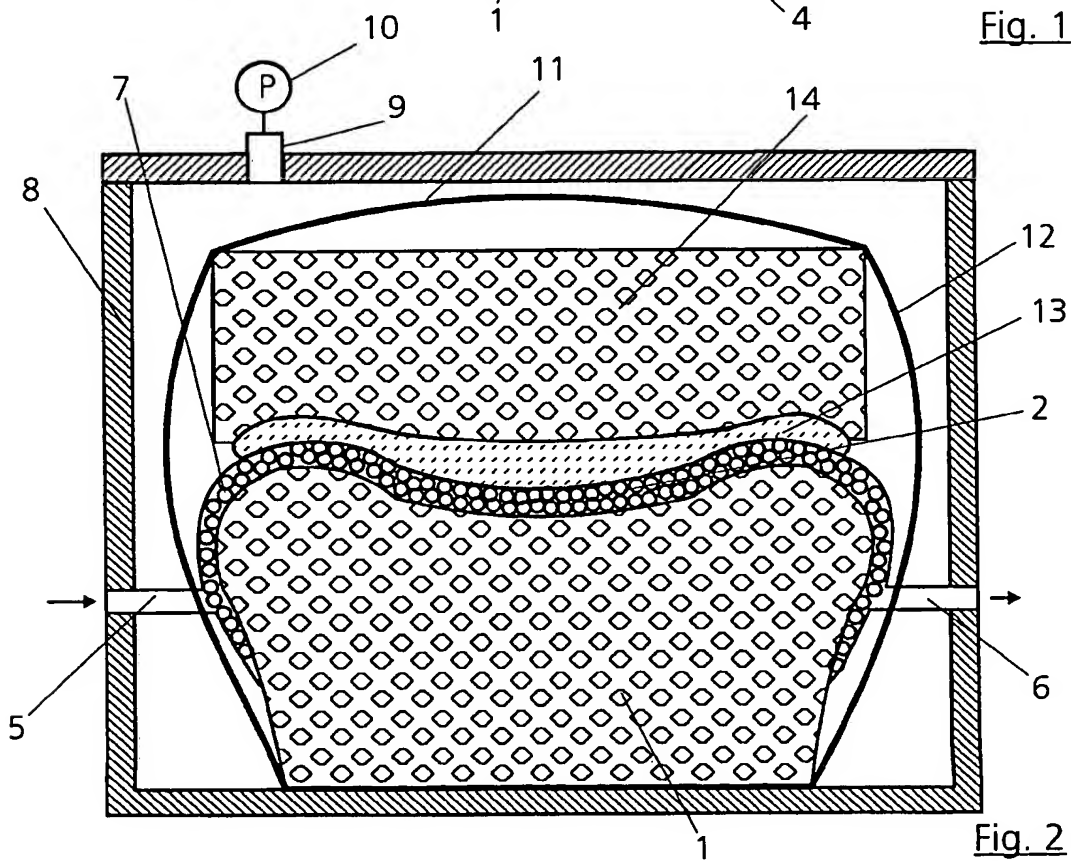


Fig. 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**